

GLOBALCONNECTIONS, LLC

TRANSLATION AND INTERPRETATION SERVICES

9400 E. Iliff Avenue, Suite 62, Denver, CO 80231 • Phone: 303.750.7611 • Fax: 303.750.7689
Email: trans@glconnections.com • <http://www.glconnections.com>

CERTIFICATE OF TRANSLATION

I certify that I am a professional translator who is fully competent in both French and English, experienced in patent translations and that I am certified by the American Translators Association (ATA) to translate from French into English, that I have made the attached translation of French Patent 2 651 132 ("Agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif et leur préparation") and that this translation is complete and correct to the best of my knowledge, ability and belief.

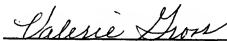


Thomas J. Clark
ATA Certified Translator
French>English

State of Pennsylvania

County of Allegheny

Signed and dated this 9th day of
January, 2007.



Notary Public

My commission expires 12-22-08

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

Notarial Seal

Valerie Gross, Notary Public

Bethel Park Boro, Allegheny County

My Commission Expires Dec. 22, 2008

Member, Pennsylvania Association of Notaries

19. FRENCH REPUBLIC
NATIONAL PATENT AND
TRADEMARK OFFICE
PARIS

11. Publication No.:
(to be used only for orders for copies)

21. National Registration No.

51. Int. Cl.⁵: A 61 K 35/78, 31/35

2 651 132

90 00935

12.

PATENT APPLICATION

A1

22. Filing date: January 26, 1990	71. Applicant(s): Pacific Chemical Co., ltd. - KP
30. Priority: August 30, 1989, KR 8912435; August 31, 1989, KR 8912493; August 31, 1989, KR 8912492	72. Inventor(s): Park Soo Nam and Boo Yong Chool
43: Date application made available to the public: March 1, 1991, Bulletin 91/09.	73. Holder(s):
56: List of documents cited in search report: The search report had not been prepared as of the date of publication of the application.	74: Agent: Société de Protection des Inventions
60: References to other national documents in the same family:	

54. Cell protection agents against active oxygen chemical species and their preparation

57. This invention relates to agents that protect cells against active oxygen chemical species which can be used as ingredients in cosmetics and can be prepared from total or purified extracts of plant materials selected, for example, from the leaves of *Camellia sinensis* L. the roots of *Alpinia officinarum* Hance and the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi containing biochemically active flavonoids such as (-)-epigallocatechine gallate, galangin or baicalein as the principal ingredient and containing these flavonoids in large quantities.

CELL PROTECTION AGENTS AGAINST ACTIVE OXYGEN CHEMICAL SPECIES AND THEIR PREPARATION

This invention relates to cell protection agents against active oxygen chemical species. The cell protection agents contain biochemically active flavonoids and it is assumed that they can be used as ingredients in cosmetics.

Active oxygen chemical species are known to cause cell damage, mutations, cancer and aging by peroxidation of lipids, degradation of proteins, alteration of nucleic acids etc. (Leibovitz, B.E. and Siegel B.W. (1980), *J. Gerontol.*, 35, 45; Foote, C.S. (1982) "Pathology of Oxygen" (A.P. Autor, ed.) Academic Press, N.Y., 21; Straight, R.C. and Spikes, J.D. (1985), "Singlet Oxygen, Vol. IV, Reaction Modes and Product, Part 2" (Frimer, A.A. ed.).

The active oxygen chemical species can include single oxygen, the hydroxyl radical, the superoxide anion radical, hydrogen peroxide etc., and a considerable amount of research is being conducted on chemical compounds and enzymes that are capable of deactivating or trapping such species.

It has been indicated previously that beta-carotene (Foote, C.S. and Denny, (1968), *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 6233) or alpha-tocopherol (Fahrenholtz, S.R. and Doleiden, F.H. (1974), *Photochemistry and Photobiology*, 20, 505-509) have an effective deactivation activity against singlet oxygen which is of major biological importance for skin cells, which are frequently exposed to sunlight.

Examples of captors of the hydroxyl radical that are known to be the most reactive with respect to active oxygen chemical species include, for example, mannitol

(Martin, J.P. and Logsdon, N. (1987), *J. Biol. Chem.* 262, 15, 7213-7219), tryptophan, formate, t-butanol, ethanol (Bors, W. and Michel, C. (1977) *Eur. J. Biochem.*, 95, 621-627) etc., while research on superoxide dismutase, an enzyme of the living organism that transforms the superoxide anion radical into hydrogen peroxide, and on catalase or glutathione peroxidase, an enzyme of the living organism that breaks down hydrogen peroxide into water and oxygen, is being actively pursued in relation to the aging of cells (Hans Nohl and Dietmar Hegner (1979), *Mechanisms of Ageing and Development*, 11, 145-151).

In recent years, certain types of flavonoids that are present in plant matter and have been used since ancient times for the treatment of a wide range of illnesses have been shown to react with various active oxygen chemical species, namely singlet oxygen (Sorata, Y., Takahama, U. and Kimura, M. (1984), *Biochem. Biophys. Acta.* 799, 31; Matuura, T., Matsushima, H., Nakashima, R. (1970), *Tetrahedron*, 26, 435; Takahama, U., Youngman, R.J., Elsther, E.F. (1984), *Photobiochem. Photobiophys.* 7, 175-181), the superoxide anion radical (Baumann, J., Wurm, G. and Bruchhausen, F.V. (1980), *Arch. Pharm.* 313, 330), the hydroxyl radical (Nasr, C., Pincemail, J., Brasseur, T. Deby, C., Haag, M., Angenot, L., Anton, R. (1987), *Ind. Int. Symp. on Plant Flavonoids in Biology and Medicine*, p. 69, Husain, S.R., Cillard, J. and Cillard, P. (1987), *Phytochemistry*, 26, 2489), and hydrogen peroxide (Barz, V., Wiermann, R. (1981) in *Proc. Int. Bioflavonoid Symp.*, pp. 185, Barz, W., Koster, J., Weltring, K.M., tractk, D.(1985), *Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur.*, 25,307; Miller, E., Schreier, P. (1985), *Food Chem.* 17,143).

In addition, with regard to flavonoids, the activity of trapping free radicals (Wolf Bors and Manfred Saran (1987), *Free Rad. Res. Comms.*, Vol. 2, No. 4-6, 289-294) and the activity of repressing the peroxidation of lipids (Younes, M., Siegers, C.P. (1981) *Planta Medica*, 43, 240) have already been studied, as has the inhibitory activity of an oxidizing enzyme of the living organism such as lipoxygenase etc. (Bauman, J., Bruchhausen, F.V. and Wurm, G. (1980), *Prostaglandins*, Vol. 20, No. 4, 627).

Nevertheless, in spite of the numerous studies cited above, flavonoids have not been used in practice as agents to protect cells against active oxygen chemical species, because these studies:

- 1) in the majority relate only to the physico-chemical reaction; or
- 2) have not advanced beyond the enzyme level, even in the cases where they involve the biochemical reaction; or
- 3) have been unable to explain the mechanism itself, although their more or less significant clinical effect is acknowledged.

Under these conditions, one inevitable consequence has been that quantitative experimental methods that are significant from a biochemical and biological point of view have not been developed.

The applicant's attention was drawn to the fact that if experimental methods were developed that are both quantitative and significant from the biochemical-biological point of view, flavonoids could be used as cell protection agents against active oxygen chemical species, because flavonoids are very useful on account of their various activities that result from their varied structures and their high levels of plant matter content. Starting

from that fact, the applicant attempted to develop and to define the experimental methods in a first phase, and conducted quantitative research using the experimental methods thus developed in a second phase.

Consequently, this invention provides a quantitative experimental method which is effective from the biochemical and biological point of view of the type that is required for the development of agents to protect cells against active oxygen chemical species, selects the flavonoids that have the most pronounced effect by means of the method thus obtained and interprets the mechanism of activity. Consequently, this invention is valuable because it makes possible the practical utilization of cell protection agents that contain biochemically active flavonoids.

This invention relates to a method to quantitatively measure the cell protection activity of flavonoids against active oxygen chemical species by means of a photohemolysis experiment on erythrocytes that are significant from a biochemical-biological point of view.

The photohemolysis experiment on erythrocytes has been conducted to interpret the mechanism of the hemolysis by the active oxygen chemical species or by light (Epiling, G.A. and Sibley, M.T. (1987), *Photochem. Photobiol.*, 46, 39; Lamola, A.A. and Doleidon, F.H. (1980), *Photochem. Photobiol.*, 31, 597; Valenzano, D.P. (1984) *Photochem. Photobiol.*, 40, 681), but it has not previously been used in a quantitative experiment, because various factors that have an influence on this experiment were not sufficiently taken into consideration. The applicant proceeded on the assumption that

although the experimental conditions allow a quantitative and significant measurement from the biochemical-biological point of view, the above experiment would be simpler than an experiment involving animals, and could provide very useful information in a short period of time. The applicant pursued its research, which yielded this invention.

As a consequence of research on the effects of various flavonoids using the experimental method for the photohemolysis of erythrocytes developed by the applicant, the new findings indicated below have been established:

- 1) In addition to the direct physico-chemical degradation reaction by the active oxygen chemical species, a secondary biochemical reaction is responsible for the photohemolysis of the erythrocytes.
- 2) The flavonoids can be classified in several groups, namely one group that reacts directly via a physico-chemical process with the active oxygen chemical species (myrecetin, quercetin etc.), a group that acts principally in the secondary biochemical reaction phase (galangin, kaempferide etc.) and a group that acts in both phases ((-)-epigallocatechine, baicalein).
- 3) When flavonoids that act respectively in different phases were processed together, their activity increased synergistically.
- 4) Among the flavonoids tested, (-)-epigallocatechine gallate exhibited a high level of activity in both phases and galangin surprisingly exhibited a particularly high level of activity in the secondary biochemical reaction phase.

The applicant has selected plant matter containing the biochemically active

flavonoids in large quantities in the manner described below to develop cell protection agents against active oxygen chemical species by applying the results of the research described above, and it has prepared cell protection agents on the basis of extracts.

- 1) *Camellia sinensis* L., (1)-epigallocatechine gallate (concentration: 8% of the dried leaves).
- 2) *Alpinia officinarum* Hance; (galangin content: 1% in the dried roots).
- 3) *Scutellaria baicalensis* Georgi; baicalein and its glycosides (concentration 3% in the dried roots).

The preparation process for the solution containing the total extract is as follows: The process is characterized in that the dry plant matter is extracted with water or an aqueous solution of ethanol, propylene glycol, butylene glycol or glycerols, by adding the water or an aqueous solution of butylene glycols [and/or]¹ glycerol to the solution containing the extract and aging the solution in a cold room. This solution itself can be used as a cell protection agent.

The detailed description and the method for the preparation of the purified extract are given in the examples presented below:

Test 1: Measurement of the cell protection activity of the flavonoids against active oxygen chemical species.

- 1) Preparation of the samples

Various flavonoids, namely galangin, (-)-epigallocatechine gallate (EGCG), quercetin, kaempferide, myrecetin, 3-hydroxyflavone, rutin, apigenin, chrysin, acacetin,

¹ Translator's Note: Something is missing at this point in the French text, which says "... en ce qu'on ajoute de l'eau ou une solution aqueuse de butylène glycols, de glycérol à la solution contenant l'extrait ...". The missing text is most likely either "and" or "or" and has been inserted in square brackets in the translation.

Baicalein, flavone, 7,8-benzoflavone, (-)-epicatechin, (+)-catechin, silybin, dihydromyricetin, taxifolin and aromadendrene and, as a reference, alpha-tocopherol (4 mmol each) were dissolved in 1.0 l of ethanol to obtain samples.

2) Measurement

Blood taken from a rabbit was centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes and washed to obtain erythrocytes which were diluted in physiological serum to prepare a suspension of erythrocytes (erythrocytes 6×10^7 / 3.5 ml). Six 10 ml Pyrex test tubes with a diameter of 1.0 cm were prepared, and 3.5 ml of the suspension were placed in each of them. Three of the six test tubes were identified as the standard group, and 50 μ l of ethanol was added to each of these test tubes. The other three test tubes were identified as the test group, and 50 μ l of the sample was added to each of these test tubes. They were then subjected to a pre-incubation in darkness for 30 minutes. When the pre-incubation period was over, 0.5 ml of an aqueous bengal rose solution (12 μ M) was added as photosensitizer, and the openings were hermetically sealed with parafilm. In a rectangular hexahedral box with dimensions of 50 x 20 x 25 cm, the interior of which was painted a dark color and equipped with a 20 W fluorescent light, the test tubes were placed at a distance of 5 cm from the lamp and irradiated for 15 minutes. The purpose of the addition of the photosensitizer and the light irradiation was to produce active oxygen chemical species.

When the irradiation was complete, the test tubes were kept in darkness and transmittances of 70 nm were measured at intervals of 15 minutes. At this wavelength,

the increase in transmittance of the erythrocyte suspension was proportional to the hemolysis of the erythrocytes.

All the experiments described above were performed at a constant ambient temperature of 27°C, and the cell protection activities of the samples against active oxygen chemical species were defined as the half hemolysis time (in minutes) required to photohemolyse 50% of the erythrocytes added under the conditions cited above.

3) Results

The results are presented in Table 1 below, and show that several flavonoids such as galangin, EGCG etc. have an activity greater than that of alpha-tocopherol.

Table 1: Cell protection effect of flavonoids against active oxygen chemical species.

Sample	Half hemolysis time (in minutes)
galangin	1800
EGCG	400
quercetin	315
kaempferide	280
myrecetin	160
baicalein	106
fisetin	87
morin	55
3-hydroxyflavone	46
rutin	32
apigenin	51
chrysin	50
acacetin	45
baicalein	32
flavone	25
7,8-benzoflavone	50
(-)-epicatechin	42
(+)-catechin	41
silybin	49
dihydorobinetin	41
taxifolin	33
aromadendrin	33
alpha-tocopherol	45
standard	32

Test 2: Synergy of galangin and EGCG

Galangin and EGCG were combined in the molar ratio of 3:1-1:3 to prepare the samples (4mM) and measurements were taken in the same manner as in Test 1. The comparison of the results with the results of Test 1 shows that galangin and EGCG have a net synergistic activity.

Table 2: Synergy of galangin and EGCG

Sample	Half hemolysis time (min.)
galangin + EGCG (1 : 1)	> 2000
galangin + EGCG (3 : 1)	> 2000
galangin + EGCG (1 : 3)	> 2000
galangin	1800
EGCG	400
α tocopherol	45
standard	32

Examples 1-6:

Preparation of the solution containing the total extract.

To 1.0 kg of dry plant matter obtained from the leaves of *Camellia Sinensis L.*, the roots of *Alpinia officinarum*, the roots of *Scutellaria baicalensis Georgi*, the leaves of *Ginkgo biloba L.*, the rinds of fruits of *Citrus tangerina Hort.* and *Tanaka* and leaves of

Acacia catechu Willd., 10 kg of ethanol at 50 (V/V) % is added, and after extracting the mixture at room temperature for 7 days, 8.0 kg of water is added to the solution containing the extract. The solution obtained is aged in a cold chamber at 10°C and filtered, each time yielding 16 kg of solution containing the total extract.

Test 3:

Measurement of the cell protection activity of the total extract of plant matter.

This test was performed to measure the cell protection activity of solutions containing a total extract obtained in Examples 1-6.

The test was conducted in the same manner as in Test 1, except that the solutions diluted with ethanol (1-10) of the solution containing the total extract were used as samples.

The results are presented in Table 3 below. According to the results, we can see that the total extracts of *Alpinia* and *Camellia* containing respectively galangin and EGCG exhibit excellent activity, and these solutions themselves can therefore be used as cell protection agents.

Table 3: Cell protection activity of the total extract

Source of the total extract	Half-hemolysis time (in minutes)
Camellia	800
Alpinia	420
Scutellaria	290
Gingko	55
Citrus	38
Acacia	42
Standard	32

Example 7:

Synergistic activity in the total extract obtained from *Camellia* and *Alpinia*

Solutions containing total extracts obtained from leaves of *Camellia Sinensis L.* and the roots of *Alpinia officinarum Hance* respectively are combined in the ratio of 1:1 (by base weight) and tested in the same manner as in Test 3. The measurement shows that the half-hemolysis time is 1200 minutes.

Example 8:

Preparation of a purified extract of *Camellia Sinensis L.*

10 kg of water is added to 1.0 kg of dry leaves of *Camellia Sinensis L.*, and the mixture obtained is extracted for two hours at 80°C while being heated. The filtrate is then concentrated to a volume of 1/5 at 50°C. 5 kg of ethanol is added to the

concentrate and, after mixing and filtering, the filtrate is concentrated until dry at 50°C to obtain 80 g of purified extract containing EGCG.

Example 9:

Extraction of galangin.

1.0 kg of ethyl acetate is added to 100 g of dry roots of *Alpinia officinarum* Hance. The mixture obtained is heated under reflux for 2 hours and, after cooling, is filtered. The filtrate is concentrated. The concentrate is subjected to column chromatography with silica gel (200 g of silica gel, column diameter 4 cm, n-hexane:ethyl acetate = 3:1 (V/V)) to obtain the fractions containing galangin, after which they are recrystallized in a mixture of n-hexanol and ethyl acetate 1:1 (V/V), which yields 0.9 g of galangin.

Example 10:

Preparation of a cell protection agent.

8 g of the purified extract of *Camellia Sinensis* L. obtained in Example 8 and 0.9 g of the galangin obtained from *Alpinia officinarum* Hance in Example 9 are dissolved in 1.6 kg of the solution containing the total extract obtained from *Scutellaria baicalensis* Georgi in Example 3 to prepare the cell protection agent. The cell protection agent thus obtained was tested in the same manner as in Test 3, and the measurement showed a half hemolysis time greater than 2000 min.

CLAIMS

1. Cell protection agent against active oxygen chemical species prepared from total or purified extracts of plant materials selected from the leaves of *Camellia sinensis* L. the roots of *Alpinia officinarum* Hance and the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi that contain at least one biochemically active flavonoid consisting of (-)-epigallocatechine gallate, galangin or baicalein as the active ingredient.
2. Cell protection agent as recited in Claim 1, in which the cell protection agent is characterized in that it contains (-)-epigallocatechine and galangin in a molar ratio of 1:3 to 3:1.
3. Cell protection agent as recited in Claim 1, characterized in that the solution containing the total extract of *Camellia sinensis* L. and the solution containing the total extract of *Alpinia officinarum* Hance are combined.
4. Cell protection agent as recited in Claim 1, in which the cell protection agent is prepared by dissolving the purified extract containing the (-)-epigallocatechine gallate obtained from *Camellia sinensis* L. and galangin extracted from *Alpinia officinarum* Hance in the solution containing the total extract of *Scutellaria baicalensis* Georgi.
5. Method for the preparation of a cell protection agent as recited in Claim 1, characterized in that the plant matter is extracted with aqueous ethanol, and that water is added to the solution containing the extract in the same quantities and that the mixture obtained is aged.

6. Method for the preparation of (-)-epigallocatechine gallate, characterized in that the leaves of *Camellia sinensis L.* are extracted with water in the proportion of 10 times their weight at 80°C, in that, after filtration, the filtrate is concentrated to a volume of 1/5, in that ethanol is added to the concentrate in the proportion of three times its weight, in that the precipitate is removed by filtration and in that the filtrate is concentrated until dry.

7. Method for the preparation of galangin, characterized in that column chromatography is performed with silica gel on the extract by the ethyl acetate of *Alpinia officinarum Hance* to obtain fractions containing galangin, and then the fractions are recrystallized in a mixture of hexane:ethyl acetate = 1:1 (V/V).

8. Cosmetic composition characterized in that it contains a cell protection agent that contains at least one flavonoid as recited in Claim 1.

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

①1 N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 651 132

②1 N° d'enregistrement national : 90 00935

⑤1 Int Cl⁸ : A 61 K 35/78, 31/35

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 26.01.90.

③0 Priorité : 30.08.89 KR 8912435; 31.08.89 KR
8912493; 31.08.89 KR 8912492.

④3 Date de la mise à disposition du public de la
demande : 01.03.91 Bulletin 91/09.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche : Le rapport de recherche n'a pas été
établi à la date de publication de la demande.

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : Société dite: Pacific Chemical Co., Ltd
— KP.

⑦2 Inventeur(s) : Park Soo Nam et Boo Yong Chool.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire : Société de Protection des Inventions.

⑤4 Agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif et leur préparation.

⑤7 La présente invention concerne des agents de protection des cellules contre des espèces chimiques à oxygène actif qui sont utiles comme constituants de cosmétiques et peuvent être préparés à partir de l'extrait total ou purifié de matières végétales, par exemple, des feuilles de *Camellia sinensis* L., des racines d'*alpinia officinarum* Hance et des racines de *Scutellaria baicalensis* Georgi contenant des flavonoïdes biochimiquement actifs tels que le gallate de (-)-épigallocatechine, la galangine ou la baicaléine comme constituant principal, et contenant ces flavonoïdes en grandes quantités.

AGENTS DE PROTECTION DES CELLULES CONTRE LES ESPECES
CHIMIQUES A OXYGENE ACTIF ET LEUR PREPARATION

La présente invention concerne des agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif. Les agents de protection des cellules contiennent des flavonoïdes biochimiquement actifs et ils sont supposés être utilisables comme constituants de cosmétiques.

Les espèces chimiques à oxygène actif sont connues pour provoquer une dégradation des cellules, des mutations, le cancer et le vieillissement par peroxydation des lipides, dégradation des protéines, altération des acides nucléiques etc. (Leibovitz, B.E. et Siegel B.W. (1980), J. Gerontol., 35,45; Foote, C.S. (1982) "Pathology of Oxygen" (A.P. Autor, éd.) Academic Press, N.Y., 21; Straight, R.C. et Spikes, J.D. (1985), "Singlet Oxygen, vol.IV, Reaction Modes and Product, Part 2" (Frimer, A.A. éd.).

Les espèces chimiques à oxygène actif peuvent comprendre l'oxygène singulet, le radical hydroxyle, le radical anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène, etc., et de nombreuses études sont en cours sur les composés chimiques et enzymes capables de les inactiver ou de les piéger.

Il a déjà été indiqué précédemment que le β -carotène (Foote, C.S. et Denny, (1968), J. Am. Chem. Soc., 90,6233) ou l' α -tocophérol (Fahrenholtz, S.R. et Doleiden, F.H. (1974), Photochemistry and photobiology, 20, 505-509) présente une activité d'inactivation efficace contre l'oxygène singulet qui a une grande importance biologique pour les cellules de la peau fréquemment exposées à la lumière solaire.

Comme capteurs du radical hydroxyle qui sont connus pour être les plus réactifs vis-à-vis des espèces chimiques à oxygène actif, on peut citer par

exemple le mannitol (Martin, J.P. et Logsdon, N. (1987), J. Biol. Chem. 262, 15, 7213-7219), le tryptophane, le formiate, le t-butanol, l'éthanol (Bors, W. et Michel, C. (1977) Eur. J. Biochem., 95, 621-627) etc., tandis
5 que des études sur la superoxyde dismutase, une enzyme de l'organisme vivant transformant le radical anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et sur la catalase ou la glutathion peroxydase, une enzyme de l'organisme vivant décomposant le peroxyde d'hydrogène en eau et en
10 oxygène sont activement poursuivis en relation avec le vieillissement des cellules (Hans Nohl et Dietmar Hegner (1979), Mechanisms of Ageing and development, 11, 145-151).

Ces dernières années, certains types de
15 flavonoïdes présents dans les matières végétales utilisées pour le traitement de maladies très diverses depuis les temps anciens se sont révélés réagir avec diverses espèces chimiques à oxygène actif, à savoir l'oxygène singulet (Sorata, Y., Takahama, U. et Kimura, M. (1984), Biochem. Biophys. Acta. 799, 31; Matuura, T., Matsushima, H., Nakashima, R. (1970), Tetrahedron, 26, 435; Takahama, U., Youngman, R.J., Elsther, E.F. (1984), Photobiochem. Photobiophys. 7, 175-181), le
20 radical anion superoxyde (Baumann, J., Wurm, G. et Bruchhausén, F.V. (1980), Arch. Pharm. 313, 330), le radical hydroxyle (Nasr, C., Pincemail, J., Brasseur, T. Deby, C., Haag, M., Angenot, L., Anton, R. (1987), Ind. Int. Symp. on Plant Flavonoids in Biology and medicine, p69, Husain, S.R., Cillard, J. et Cillard, P. (1987), Phytochemistry, 26, 2489), et le peroxyde d'hydrogène (Barz, W., Wiermann, R. (1981) dans Proc. Int. Bioflavonoid Symp., pp185, Barz, W., Koster, J., Weltring, K.M., tractk, D. (1985), Ann. Proc. Phytochem. Soc. Eur., 25, 307; Miller, E., Schreier, P. (1985),
30 Food Chem. 17, 143).

En outre, en ce qui concerne les flavonoïdes, l'activité de piégeage des radicaux libres (Wolf Bors et Manfred Saran (1987), Free Rad. Res. Comms., vol.2, n°4-6, 289-294) et l'activité de répression de la peroxydation des lipides (Younes, M., Siegers, C.P. (1981) Planta Medica, 43, 240) ont déjà été étudiées et on a également étudié l'activité--inhibitrice pour une enzyme oxydante de l'organisme vivant telle que la lipoxygénase etc. (Baumann, J., Bruchhausen, F.V. et Wurm, G. (1980), Prostaglandins, vol.20, n°4, 627).

Cependant, malgré les nombreuses études précitées, les flavonoïdes n'ont pas pu être utilisés dans la pratique comme agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif, car ces études :

1) concernent pour la plupart uniquement la réaction physicochimique ; ou

2) n'ont pas pu s'écarter du niveau enzymatique même dans le cas du traitement de la réaction biochimique ; ou

3) n'ont pas pu expliquer le mécanisme même si leur efficacité plus ou moins élevée en clinique est reconnue.

Dans ces conditions, une conséquence inévitable a été que des méthodes expérimentales quantitatives et significatives du point de vue biochimique et biologique n'ont pas été mises au point.

La demanderesse a porté son attention sur le fait que si l'on mettait au point des méthodes expérimentales quantitatives et significatives du point de vue biochimique-biologique, les flavonoïdes seraient utilisables comme agents de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif car les flavonoïdes ont une grande utilité en raison de leurs diverses activités résultant de leurs structures

variées et de leurs teneurs élevées dans les matières végétales. Partant de ce fait, la demanderesse a essayé dans un premier stade de mettre au point et d'établir les méthodes expérimentales, et elle a effectué dans un
5 second stade des études quantitatives au moyen des méthodes expérimentales ainsi obtenues.

Par conséquent, la présente invention fournit une méthode expérimentale quantitative et efficace du point de vue biochimique et biologique nécessaire pour
10 le développement d'agents protecteurs des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif, elle choisit des flavonoïdes présentant l'effet le plus prononcé au moyen de la méthode ainsi obtenue et elle interprète le mécanisme de l'activité ; en conséquence,
15 la présente invention est précieuse pour permettre l'utilisation pratique des agents protecteurs des cellules contenant des flavonoïdes biochimiquement actifs.

La présente invention concerne un procédé
20 pour mesurer quantitativement l'activité de protection des cellules des flavonoïdes contre les espèces chimiques à oxygène actif au moyen d'une expérience de photohémolyse des érythrocytes significative du point de vue biochimique-biologique.

L'expérience de photohémolyse des érythrocytes a été effectuée pour interpréter le mécanisme de l'hémolyse par les espèces chimiques à oxygène actif ou par la lumière (Epiling, G.A. et Sibley, M.T. (1987), Photochem. Photobiol., 46,39;
30 Lamola, A.A. et Doleidon, F.H. (1980), Photochem. Photobiol., 31,597, Valenzano, D.P. (1984) Photochem. Photobiol., 40,681), mais elle n'a pas été utilisée dans une expérience quantitative, car divers facteurs influants sur cette expérience n'ont pas été
35 suffisamment pris en considération. La demanderesse a

supposé que si les conditions expérimentales permettant une mesure quantitative et significative du point de vue biochimique-biologique étaient établies, l'expérience ci-dessus serait plus simple que
5 l'expérience sur l'animal et pourrait fournir des informations très utiles en peu de temps. Elle a poursuivi les études pour aboutir à la présente invention.

Comme conséquence des études sur les effets
10 de divers flavonoïdes en utilisant la méthode expérimentale de photohémolyse des érythrocytes mise au point, les faits nouveaux suivants ont été établis :

1) En plus de la réaction de dégradation physico-chimique directe par les espèces chimiques à oxygène actif, une réaction biochimique secondaire est
15 responsable de la photohémolyse des érythrocytes.

2) Les flavonoïdes peuvent être classés en plusieurs groupes, à savoir un groupe réagissant directement par voie physico-chimique avec les espèces
20 chimiques à oxygène actif (myricétine, quercétine, etc.), un groupe agissant principalement dans le stade de réaction biochimique secondaire (galangine, kaempférol, etc.) et un groupe agissant dans les deux stades ((-)-épigallocatechine, baicaléine).

3) Lorsque des flavonoïdes agissant respectivement dans des stades différents ont été traités ensemble, l'activité a été augmentée d'une
25 manière synergique.

4) Parmi les flavonoïdes essayés le gallate de (-)-épigallocatechine a présenté une forte activité
30 dans les deux stades et la galangine a présenté d'une manière surprenante une activité particulièrement forte dans le stade de la réaction biochimique secondaire.

La demanderesse a choisi les matières
35 végétales contenant les flavonoïdes biochimiquement

actifs en grandes quantités de la manière décrite ci-après en vue de mettre au point les agents protecteurs des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif en appliquant les résultats de l'étude ci-dessus, et elle a préparé des agents protecteurs des cellules à partir des extraits.

1) *Cammellia sinensis* L., gallate de (1)-épigallocatechine (teneur : 8% des feuilles sèches).

2) *Alpinia officinarum* Hance ; (galangine teneur : 1% dans les racines sèches).

3) *Scutellaria baicalensis* Georgi ; baicaléine et ses glycosides (teneur 3% dans les racines sèches).

Le procédé de préparation de la solution contenant l'extrait total est le suivant : le procédé est caractérisé en ce qu'on extrait les matières végétales sèches avec de l'eau ou une solution aqueuse d'éthanol, de propylèneglycol, de butylèneglycols ou de glycérols, en ce qu'on ajoute de l'eau ou une solution aqueuse de butylèneglycols, de glycérol à la solution contenant l'extrait et en ce qu'on la fait vieillir dans une chambre froide. Cette solution peut être utilisée elle-même comme agent de protection des cellules.

La description détaillée et le procédé de préparation de l'extrait purifié seront donnés dans les exemples ci-dessous.

Essai 1 : Mesure de l'activité de protection des cellules des flavonoïdes contre les espèces chimiques à oxygène actif.

1) Préparation des échantillons

Divers flavonoïdes, à savoir la galangine, le gallate de (-)-épigallocatechine (EGCG), la quercétine, le kaempférol, la myricétine, la 3-hydroxyflavone, la rutine, l'apigénine, la chrysine, l'acacétine, la

baicaline, la flavone, la 7,8-benzoflavone, la (-)-épicatechine, la (+)-catéchine, la silybine, la dihydrorobinétine, la taxifoline et l'aromadendrine et, comme témoin, l' α -tocophérol (chacun 4 mmoles) ont été dissous dans 1,0l d'éthanol pour obtenir des échantillons.

2) Mesure

Du sang prélevé sur un lapin a été centrifugé à 3 000 tours/min. pendant 5 minutes et lavé pour obtenir des érythrocytes qui ont été dilués dans du sérum physiologique pour préparer une suspension d'érythrocytes (érythrocytes 6×10^7 /3,5 ml). Six tubes à essais en Pyrex de 10 ml de 1,0 cm de diamètre ont été préparés, et l'on a introduit dans chacun d'eux 3,5 ml de la suspension. Trois des six tubes à essais ont été pris comme groupe témoin, et on leur a ajouté respectivement 50 μ l d'éthanol. Les trois autres tubes à essais ont été pris comme groupe d'essais et on leur a ajouté 50 μ l d'échantillon respectivement, puis on les a soumis à une préincubation dans l'obscurité pendant 30 minutes. Lorsque la préincubation était terminée, on a ajouté 0,5 ml d'une solution aqueuse de rose bengale (12 μ M) comme photosensibilisant, et les ouvertures ont été bouchées hermétiquement avec du para-film. Dans une boîte hexahédrique rectangulaire de 50x20x25 cm, dont l'intérieur a été peint dans une couleur foncée et équipée d'une lampe fluorescente de 20W, les tubes à essais ont été disposés à une distance de 5cm de la lampe et irradiés pendant 15min. Le but de l'addition du photosensibilisant et de l'irradiation par la lumière était de produire des espèces chimiques à oxygène actif.

Lorsque l'irradiation était terminée, les tubes à essais ont été maintenus à l'obscurité et les transmittances à 700nm ont été mesurées à des

intervalles de 15 minutes. A cette longueur d'onde, l'augmentation de transmittance de la suspension d'érythrocyte était proportionnelle à l'hémolyse des érythrocytes.

- 5 Toutes les expériences décrites ci-dessus ont été effectuées à une température ambiante constante de 27°C, et les activités de protection des cellules des échantillons contre les espèces chimiques à oxygène actif ont été définies comme le temps de demi-hémolyse
- 10 (en minutes) nécessaire pour photohémolyser 50% des érythrocytes ajoutés dans les conditions ci-dessus.

3) Résultats

- Les résultats sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous, qui montre que plusieurs flavonoïdes tels que galangine, EGCG etc. ont une activité supérieure à
- 15 celle de l' α -tocophérol.

Tableau 1 : Effet de protection des cellules des flavonoïdes contre les espèces chimiques à oxygène actif.

5	-----	
	Echantillon	Temps de demi-hémolyse (min.)
-----		-----
10	galangine	1800
	EGCG	400
	quercétine	315
	kaempférol	280
	myricétine	160
15	baicaléine	106

	fisétine	87
	morine	55
	3-hydroxyflavone	46
20	rutine	32
	apigénine	51
	chrysine	50
	acacétine	45
	baicaline	32
25	flavone	25
	7,8-benzoflavone	50
	(-)-épicatéchine	42
	(+)-catéchine	41
	silybine	49
30	dihydorobinétine	41
	taxifoline	33
	aromadendrine	33

	α -tocophérol	45

35	témoin	32

Essai 2 : Activité synergique de la galangine et de l'EGCG.

5 La galangine et l'EGCG ont été combinés dans le rapport molaire de 3:1-1:3 pour préparer des échantillons (4mM) et des mesures ont été effectuées de la même manière que dans l'essai 1. La comparaison des résultats avec ceux de l'essai 1 montre que la galangine et l'EGCG ont une nette activité synergique.

10

Tableau 2 : Synergie de la galangine et de l'EGCG.

Echantillon	Temps de demi-hémolyse (min.)
galangine + EGCG(1:1)	>2000
galangine + EGCG(3:1)	>2000
galangine + EGCG(1:3)	>2000
galangine	1800
20 EGCG	400
-----	-----
α-tocophérol	45
-----	-----
témoin	32
-----	-----

Exemples 1-6 :

Préparation de la solution contenant l'extrait total.

30 Pour 1,0 kg de matières végétales sèches obtenues à partir de feuilles de Camellia Sinensis L., de racines d'Alpinia officinarum, de racines de Scutellaria baicalensis Georgi, de feuilles de Ginkgo biloba L., d'écorces de fruits de Citrus tangerina Hort. et de Tanaka et de feuilles d'Acacia catechu

35

Willd, on a ajouté 10kg d'éthanol à 50(V/V)% et, après avoir extrait le mélange à la température ambiante pendant 7 jours, on a ajouté 8,0 kg d'eau à la solution contenant l'extrait. La solution obtenue a été vieillie
5 en chambre froide à 10°C et filtrée pour donner à chaque fois 16 kg de solution contenant l'extrait total.

Essai 3 :

10 Mesure de l'activité de protection des cellules de l'extrait total de matières végétales.

Cet essai a été effectué pour mesurer l'activité de protection des cellules des solutions contenant un extrait total obtenues dans les exemples 1 à 6.

15 L'essai a été effectué de la même manière que dans l'essai 1 excepté que les solutions diluées par l'éthanol (1- 10) de la solution contenant l'extrait total ont été utilisées comme échantillons.

20 Les résultats sont donnés dans le tableau 3 ci-dessous. D'après les résultats, on peut voir que les extraits totaux d'Alpinia et de Camellia contenant respectivement de la galangine et de l'EGCG présentent une excellente activité, et L'on estime que ces solutions peuvent être utilisées elles-mêmes comme
25 agents de protection des cellules.

Tableau 3 : Activité de protection des cellules de l'extrait total

	Source d'extrait total	Temps de demi-hémolyse (min.)
5	-----	-----
	Camellia	800
	Alpinia	420
	Scutellaria	290
	-----	-----
10	Ginko	55
	Citrus	38
	Acacia	42
	-----	-----
15	Témoin	32
	-----	-----

Exemple 7 :

Activité synergique dans l'extrait total obtenu à partir de Camellia et d'Alpinia

20 Des solutions contenant des extraits totaux obtenus à partir de feuilles de Camellia Sinensis L. et de racines d'Alpinia officinarum Hance respectivement, ont été combinées dans le rapport de 1:1 (en poids de base) et essayées de la même manière que dans l'essai

25 3. La mesure montre que le temps de demi-hémolyse est de 1200 min.

Exemple 8 :

Préparation d'un extrait purifié de Camellia Sinensis L.

30 A 1,0 kg de feuilles sèches de Camellia Sinensis L., on ajoute 10 kg d'eau et on extrait le mélange obtenu pendant deux heures à 80°C tout en chauffant, puis on concentre le filtrat à un volume de 1/5 à 50°C. On ajoute au concentré 5 kg d'éthanol et,

35

après avoir mélangé et filtré, on concentre le filtrat à sec à 50°C pour obtenir 80g d'extrait purifié contenant de l'EGCG.

Exemple 9 :

- 5 Extraction de la galangine.
- A 100g de racines sèches d'*Alpinia officinarum* Hance, on ajoute 1,0kg d'acétate d'éthyle. On chauffe le mélange obtenu sous reflux pendant 2 heures et, après refroidissement, on le filtre. On
- 10 concentre le filtrat. On soumet le concentré à une chromatographie sur colonne avec du gel de silice (gel de silice 200g, diamètre de la colonne 4cm, n-hexane : acétate d'éthyle = 3:1(V/V)) pour obtenir les fractions
- 15 contenant de la galangine, après quoi on les fait recristalliser dans un mélange de n-hexanol et d'acétate d'éthyle 1:1(V/V), ce qui donne 0,9g de galangine.

Exemple 10 :

- Préparation d'un agent de protection des
- 20 cellules.
- On dissout 8g de l'extrait purifié de *Camellia Sinensis* L. obtenu dans l'exemple 8 et 0,9g de la galangine obtenue à partir d'*Alpinia officinarum* Hance dans l'exemple 9 dans 1,6kg de la solution
- 25 contenant l'extrait total obtenue à partir de *Scutellaria baicalensis* Georgi dans l'exemple 3 pour préparer l'agent de protection des cellules. L'agent de protection des cellules ainsi obtenu a été essayé de la même manière que dans l'essai 3, et la mesure a montré
- 30 un temps de demi-hémolyse supérieur à 2000 min.

REVENDECATIONS

1. Agent de protection des cellules contre les espèces chimiques à oxygène actif préparé à partir d'extraits totaux ou purifiés de matières végétales choisies parmi les feuilles de *Camellia sinensis* L., des racines d'*Alpinia officinarum* Hance et des racines de *Scutellaria baicalensis* Georgi qui contient au moins un flavonoïde biochimiquement actif constitué par du gallate de (-)-épigallocatechine, de la galangine ou de la baicaléine comme constituant actif.

2. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, dans lequel l'agent de protection des cellules est caractérisé en ce qu'il contient de la (-)-épigallocatechine et de la galangine dans le rapport molaire de 1:3 à 3:1.

3. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, caractérisé en ce qu'on combine la solution contenant l'extrait total de *Camellia sinensis* L. et la solution contenant l'extrait total de *Alpinia officinarum* Hance.

4. Agent de protection des cellules suivant la revendication 1, dans lequel l'agent de protection des cellules est préparé en dissolvant l'extrait purifié contenant du gallate de l'(-)-épigallocatechine obtenu à partir de *Camellia sinensis* L. et de la galangine extraite d'*Alpinia officinarum* Hance dans la solution contenant l'extrait total de *Scutellaria baicalensis* Georgi.

5. Procédé de préparation d'un agent de protection des cellules selon la revendication 1 qui est caractérisé en ce qu'on extrait les matières végétales avec de l'éthanol aqueux, en ce qu'on ajoute de l'eau à la solution contenant l'extrait dans les mêmes quantités et en ce qu'on fait vieillir le mélange obtenu.

6. Procédé de préparation de gallate de (-)-épigallocatechine qui est caractérisé en ce qu'on extrait les feuilles de *Camellia sinensis* L. avec de l'eau à raison de 10 fois leur poids à 80°C, en ce que, après filtration, on concentre le filtrat à un volume de 1/5, en ce qu'on ajoute au concentré de l'éthanol à raison de trois fois son poids, en ce qu'on élimine le précipité par filtration et en ce qu'on concentre le filtrat à sec.

7. Procédé de préparation de la galangine qui est caractérisé en ce qu'on effectue une chromatographie sur colonne avec du gel de silice sur l'extrait par l'acétate d'éthyle d'*Alpinia officinarum* Hance pour obtenir des fractions contenant de la galangine, puis on recristallise les fractions dans un mélange hexane:acétate d'éthyle=1:1(V/V).

8. Composition cosmétique qui est caractérisée en ce qu'elle comprend un agent de protection des cellules comprenant au moins un flavonoïde selon la revendication 1.